

# ДІЯ ЕНЗИМНИХ МОЛОКОЗСІДАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ПРОТЕЇНОВИЙ КОМПЛЕКС МОЛОКА

С. В. БОРОДАЙ, З. В. БОНДАРЧУК

Технологічний інститут молока та м'яса УААН, Київ

E-mail: [timm@fm.com.ua](mailto:timm@fm.com.ua)

В огляді наведено результати аналізу літератури і власні дані авторів щодо специфічності дії молокозсідальних ензимних препаратів на протеїновий комплекс молока, зокрема на одну з його складових —  $\kappa$ -казеїнову фракцію. Проаналізовані дані свідчать про те, що умови утворення сичужного згустку у виробництві сиру відомі, але механізм процесу зсідання досі є дискусійним. Показано, що досліджувані ензимні препарати істотно відрізняються за своїми властивостями стосовно специфічності протеолізу протеїнів молока.

**Ключові слова:** ензими, протеїни, молоко, протеоліз, сир.

У результаті дії молокозсідальних ензимних препаратів на протеїновий комплекс молока досить глибоких перетворень зазнає основний протеїн молока — казеїн.

Специфічність дії молокозсідальних ензимів полягає у їхній здатності розщеплювати пептидний зв'язок між 105(Фен) та 106(Мет) амінокислотами в ланцюгу первинної структури  $\kappa$ -казеїну. В результаті цієї дії молекула  $\kappa$ -казеїну розщеплюється і утворюються пара- $\kappa$ -казеїн та глікомакропептид (ГМП). Процес відщеплення ГМП від  $\kappa$ -казеїну характеризує закінчення ензиматичної фази зсідання молока [1, 2]. Подальший протеоліз казеїну супроводжується повільним накопиченням поліпептидних фрагментів ензимів та залишків їх розщеплення.

З метою розширення даних про дію молокозсідальних ензимних препаратів на казеїновий комплекс молока, зокрема  $\kappa$ -казеїн, проведено порівняльні дослідження процесу накопичення ГМП залежно від виду ензимних препаратів.

Відомо, що склад ГМП гетерогенний. Він містить до 30% вуглеводів, зокрема залишок N-ацетилнейрамінової кислоти, локалізований на кінці вуглевод-поліпептидного ланцюга, — близько 8% [42, 43].

Виробництво сиру — яскравий приклад спрямованого і контрольованого перебігу протеолізу протеїнів молока. Ключовим процесом у виготовленні сиру є коагуляція молока ензимами, від видоспецифічності дії

яких на казеїн значною мірою залежить якість і вихід готового продукту.

Молокозсідальна здатність ензимів залежить від багатьох чинників, насамперед від їхніх структурно-функціональних і фізико-хімічних властивостей, умов коагуляції (кислотності, температури, мінерального складу молока тощо).

Молокозсідальний ензим є визначальним чинником отримання молочного згустку, оскільки відіграє роль дестабілізатора колоїдно-дисперсної системи молока. При цьому від видоспецифічності його дії залежить весь хід технологічного процесу виробництва сиру і, в кінцевому підсумку, якість готового продукту. Встановлено, що необхідною умовою для зсідання молока і утворення згустку потрібної якості є здатність ензиму розщеплювати пептидний зв'язок у молекулі  $\kappa$ -казеїну, а саме Фен(105) — Мет(106). Здатність впливати на цей зв'язок виявлена у низки протеаз рослинного, тваринного та мікробного походження.

Слід зазначити, що дія сичужного ензиму (ренін К.Ф. 3.4.23.4) на молекули казеїнового комплексу молока з моменту його внесення в підготовлену молочну суміш і до закінчення визрівання сиру настільки специфічна, що й на сьогодні він — поза конкуренцією серед інших подібних препаратів. Допускається використання його замінників у виробництві натуральних сирів [3, 4, 5].

У разі використання як зсідальних агентів різних протеаз мікробного походження

відзначаються як позитивні (швидше проходить зсідання молока й визрівання сирів), так і негативні (втрата сухих речовин під час оброблення згустку і сирного зерна, що призводить до більш ніжної структури, появи вад смаку та консистенції у сирів) явища [6–8]. Вищезазначені явища є наслідком головним чином того, що мікробним молокозсідальним ферментам, порівняно із сичужними, притаманна переважно підвищена протеолітична активність і відповідна дія на основні компоненти казеїнового комплексу [9–11].

З метою отримання більш повної інформації щодо протеолізу казеїну молокозсідальними ферментними препаратами доцільно докладніше розглянути структурну будову казеїнової міцели та її основних компонентів.

Міцела казеїну є колоїдною структурою змішаного складу, має властивості гідрофільного та гідрофобного золя, який за певних умов (наприклад, під дією ферментів) необоротно переходить у гель. Структура міцели казеїну остаточно не з'ясована, хоча існує декілька її моделей [12–14], у тому числі — субодиночна [15, 16].

Субміцели утворюються внаслідок гідрофобних взаємодій, а міцели — за рахунок колоїдного фосфату кальцію. Казеїнова міцела є композицією сферичних субодиноць, що містять  $\alpha_s$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїни в приблизному співвідношенні 3:3:1 [17–20].

Оскільки кожна міцелярна субодиноця має гідрофільні та гідрофобні зони, побудова міцели, починаючи з центральної субодиноці, не є однорідною за всіма напрямками. Результатом такої побудови є отримання пористої структури міцели казеїну, яка є легкопроникною для мономерів казеїну й ферментів, що мають близькі розміри. Garnier [21], припускаючи рівномірне розподілення субодиноць у складі міцел казеїну, показав, що всі основні компоненти казеїну завдяки наявності порожнин і каналів у міцелах однаково доступні до взаємодії реагентів з молекулярною масою до 36 000.

Фізичні й хімічні властивості казеїну залежать від його первинної структури, оскільки розташування амінокислотних залишків визначає просторову структуру молекул. Знання амінокислотної послідовності у поліпептидних ланцюгів молекул основних компонентів казеїну має вирішальне значення для розуміння механізмів утворення міцел, дії ферментативних систем у процесах коагуляції молока, оброблення згустку і подальших перетворень під час визрівання сирів.

Аналіз опублікованих даних свідчить про те, що структурна будова казеїнової міцели та її основних компонентів є визначальною в процесі фермент-субстратних взаємодій. Молокозсідальні ферменти піддають гідролізу цілий ряд поліпептидних зв'язків не тільки в молекулах  $\kappa$ -казеїну, а й  $\alpha_s$ - і  $\beta$ -казеїнів [11].

Глибина дії молокозсідальних ферментів на казеїнові міцели залежить не тільки від їхньої структурної організації, а й від природи і властивостей використовуваних коагулянтів. Тому до останніх у сироробній галузі висувають особливі вимоги. Помірний і виключно специфічний характер протеолізу є одним з основних чинників у формуванні необхідних органолептичних і фізико-хімічних показників готового продукту.

Використання високоякісних препаратів сичужного ферменту для зсідання молока сприяє отриманню продукту гарантованої якості. Найкращих результатів можна досягти в разі використання «класичного» сичужного ферменту з оптимальним співвідношенням реніну та пепсину. Технічні препарати сичужного ферменту (препарати ВНИИМС) містять 30–40% пепсину. Коагуляція молока відбувається в разі використання будь-якого з наведених ферментів, однак основне «навантаження» цього процесу припадає на ренін.

Стійкий дефіцит ферментних препаратів тваринного походження спонукав спеціалістів до пошуку подібних за дією замінників серед мікробних протеаз.

Здатність ферменту до коагуляції молока недостатня для того, щоб даний препарат вважати задовільним замінником «класичного» сичужного, оскільки не менш важливу роль має відповідна протеолітична активність. Підвищена протеолітична активність може призвести до виникнення низки негативних наслідків.

Вивчення численних опублікованих матеріалів, пов'язаних з питанням використання мікробних молокозсідальних протеаз, дозволяє зробити висновок, що у виробництві сирів доцільно застосовувати лише ті ферменти, які за своїми функціональними властивостями близькі до натурального сичужного і відповідають сучасним критеріям оцінки молокозсідальних препаратів.

Основними характеристиками ферментних препаратів, що їх використовують як замінники сичужного ферменту, є такі: молокозсідальна, протеолітична активність, відношення молокозсідальної активності до протеолітичної. Відомі результати дослідження, які свідчать

про те, що в сироробстві слід використовувати ензимні препарати з конкретним відношенням молокозсідальної активності до протеолітичної. Показано, що за специфічністю гідролізу казеїну ензимні препарати, рекомендовані як замітники сичужного ензиму, мають відповідати таким вимогам: протягом 3 год за температури 35 °C та рН 6,5 гідролізувати не більше 10%  $\alpha_s$ -фракції і 6%  $\alpha_2$ -фракції казеїнів [9, 22, 23]. На основі вивчення кінетики взаємодії міцел казеїну з ензимами мікробного походження було запропоновано метод стандартизації промислових молокозсідальних ензимів турбодиметричним реєструванням процесу [24].

Слід зазначити, що для стандартизації молокозсідальних препаратів мікробного походження досі не розроблено уніфікованої методики визначення їхньої ензиматичної активності й дотепер для визначення характеристик ензимів, які використовують у сироробстві, застосовують різні методи.

У зв'язку з цим проблема розроблення методу, що дозволить оцінювати придатність мікробних коагулянтів для сироробної галузі, є вкрай актуальною.

Усі замітники сичужного ензиму досить чутливі до умов навколишнього середовища, що в поєднанні зі специфічністю дії може істотно впливати на мікробіологічні й біохімічні процеси під час визрівання сирів і, отже, на якість готового продукту. Ці аргументи зумовлюють необхідність вважати за потрібне диференціювання функціональних властивостей молокозсідальних препаратів та використання їх з урахуванням технологічних параметрів виробництва і визрівання різних видів сирів.

Біохімічні властивості ензимів залежать не тільки від їхнього амінокислотного складу, але й від послідовності розташування останніх в поліпептидному ланцюгу (первинна структура), яка й зумовлює виключно специфічні властивості конкретного ензиму. Вивчаючи дію молокозсідальних ензимів як тваринного, так і мікробного походження, встановили, що наявність трьох залишків по обидва боки від точки розщеплення в субстраті є мінімальною вимогою для отримання певної нормальної активності [25].

Послідовність амінокислот у поліпептидному ланцюгу визначено у багатьох ензимів, хоча третинну структуру — тільки для обмеженої кількості молокозсідальних ензимів [26].

Поліпептидний ланцюг вивчених протеаз складений у дві частини, що відокремлені глибокою порожниною, в якій локалізуються активна частина. Значна частина

молекули має так звану  $\beta$ -листову структуру, яку складають, в основному, гідрофобні паралельно і не паралельно орієнтовані пептидні зв'язки. Встановлено, що ділянка порожнини є місцем каталітичної дії. У порожнині активного центру дві карбоксильні групи залишків аспарагінової кислоти перебувають у тісному контакті одна з одною. Ці групи відіграють вирішальну роль в каталітичному механізмі [11].

Проведений аналіз властивостей молокозсідальних ензимних препаратів, що їх якнайширше використовують останнім часом, свідчить про те, що характер їхньої дії на казеїн виключно індивідуальний і залежить від умов навколишнього середовища. Іншими словами, дія будь-якого ензиму абсолютною видоспецифічна.

Під час ензиматичного зсідання молока різниця в характері гідролізу казеїну зумовлена специфічністю дії молокозсідальних ензимів.

З повною достовірністю показано, що ренін розщеплює Фен(105)–Мет(106)-пептидний зв'язок молекули  $\alpha_2$ -казеїну [27–29]. Інші протеази, застосовувані як зсідальний агент, очевидно, також розщеплюють цей зв'язок [30].

Дія ензимів на такий складний субстрат, як казеїн, супроводжується розщепленням не тільки  $\alpha_2$ -казеїну, але й  $\alpha_s$ - та  $\beta$ -фракцій. Складність питання специфічності дії молокозсідальних ензимів полягає в тому, що чутливість до ензиму притаманна певним зв'язкам у казеїновій міцелі. Відповідь на це питання може слугувати рішенням до визначення повної специфічності дії молокозсідальних ензимів на казеїн та критеріїв визначення їх використання у виробництві сиру.

У результаті багаторічних досліджень ензим-субстратної (ренін–казеїн) взаємодії було зроблено такі висновки:

- специфічність дії реніну на нативний казеїн не обмежується гідролізом Фен — Мет-зв'язку в молекулі  $\alpha_2$ -казеїну [31, 25];

- специфічність дії реніну на  $\alpha_s$ -казеїн залежить від агрегації субстрату а також від значення рН [11];

- $\beta$ -казеїн розщеплюється реніном тільки на декількох певних ділянках поліпептидного ланцюгу, які суттєво відрізняються за чутливістю до ензиму [27, 32, 33].

Після доведення факту розщеплення реніном тільки одного зв'язку в молекулі  $\alpha_2$ -казеїну, що локалізований в С-кінцевій частині, було синтезовано короткі пептиди, які моделюють амінокислотну послідовність

навколо лабільного Фен — Мет-зв'язку, щоб використовувати їх як субстрати для виявлення специфічної протеолітичної активності ренину та його замінників мікробного походження. Встановлено, що поряд з очевидною схожістю в характері дії протеаз, отриманих із *Mucor miehei* і *Mucor pusillus*, існує різниця, зокрема стосовно величини константи Міхаеліса (0,1 мМ у мікробних протеаз проти 1,0 мМ у ренину) [34].

Як показано Nitschmann et al. [35], крива залежності NPN (непротеїнової азотистої фракції, що відщеплюється від  $\alpha$ -казеїну) від часу для ренину є специфічною. Після закінчення первинної реакції відщеплення ГМП від  $\alpha$ -казеїну крива йде паралельно осі часу, тобто NPN не збільшується.

У разі, якщо показник NPN продовжує зростати, можна говорити про нашарування двох реакцій — первинного і подальшого протеолізу. Низку експериментальних даних, які констатують наявність неспецифічного протеолізу казеїну пепсином і мікробними протеазами, наведено в роботах [2, 36].

Однак до останнього часу остаточної відповіді на питання щодо відщеплення ГМП від казеїнових міцел та змінення кількості NPN у процесі їх протеолізу під дією різних молокозсідальних ензимних препаратів не отримано.

Alais et al. [1] і Benkha [37] відзначають, що під час оцінювання показників якості молокозсідальних препаратів (особливо, коли йдеться не про ренин) недостатньо враховувати момент початку коагуляції. Слід звертати увагу на процеси дезагрегації казеїнових міцел з відщепленням ГМП від  $\alpha$ -казеїну, коагуляції і неспецифічного протеолізу.

Дія ренину на  $\alpha$ -казеїн супроводжується не тільки відщепленням розчинного в трихлороцтовій кислоті (ТХО) ГМП, але й подальшим протеолізом  $\alpha_s$ - та  $\beta$ -казеїнів.

У нашій роботі ми використовували казеїновий комплекс, який отримували із сирого знежиреного молока методом кислотного осадження 1 М НСІ, рН 4,6 [38, 39]. Процедури осадження, промивання і розчинення проводили тричі. Після третього розчинення отриманого протеїну 1 М NaOH преципітат одержували закисненням до рН 4,0 оцтовою кислотою і проводили екстрагування протеаз молока протягом 5 год за температури 4 °С. Осад двічі промивали дистильованою водою, перемішували, розчиняли, доводячи до рівня рН 6,8. Отриманий розчин пропускали на воронці Бюхнера крізь імпрегноване активоване вугілля,

а фільтрат 15 хв центрифугували при 10 000 g для очищення від залишків вугілля. Після цього протеїн переосаджували з використанням деіонізованої води, стерилізували, пропускаючи крізь фільтр Зейтца, розчиняли в мінімальній кількості гістидин-НСІ-буфера при рН 7,0 і після заморожування за температури -40 °С сублімаційно висушували.

Використовували еталонний зразок сичужного ензиму (ренин) і ензимний препарат ВНИИМС із молокозсідальною активністю 100 000 умовних одиниць виробництва ВАТ «Московський завод сичужного ензиму» (Росія), ензим мікробного походження Мейто «Microbial meito rennet», активністю 300 000 умовних одиниць, виробництва фірми Meito Sangyo Co., LTD (Японія).

За необхідності очищення ензимів проводили таким чином. Попередньо розчинений і витриманий за постійного перемішування ензимний препарат підлягав центрифугуванню при 12 000 g на лабораторній центрифусі, тип 310 (Польща), проточному діалізу за 4 °С проти 0,01 М гістидин-НСІ-буфера, рН 7,0. Здійснювали холодну стерилізацію і сублімаційно висушували.

Молокозсідальну активність ензимних препаратів визначали за методом Машек і Гавлової [40], протеолітичну активність — за методом Benkhe [37].

Визначення кількості сіалових кислот (N-ацетилнейрамінової) проводили, послуговуючись методом Hess et al. [41], у нашій модифікації.

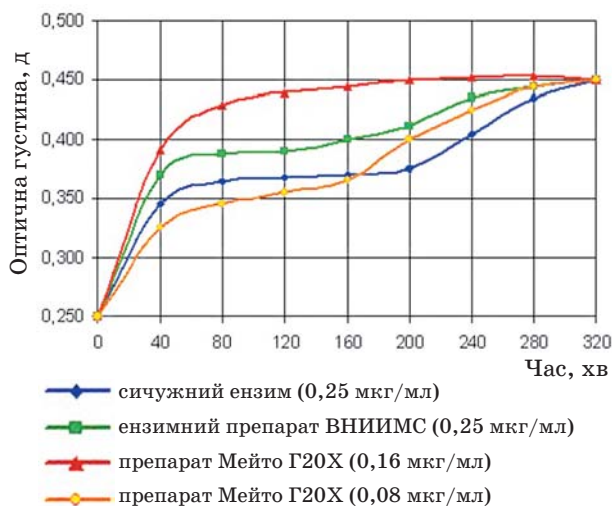
До 100 см<sup>3</sup> модельного розчину (2,8%-й розчин казеїнового комплексу в 0,01 М фосфатному буфері, рН 6,8) додавали відповідним чином розраховану кількість досліджуваного ензимного препарату (за еквівалентом ензим-субстратного співвідношення у сиробстві), попередньо розчиненого в 0,01 М фосфатному буфері, і витримували за 32 °С у водяній бані. Через певні проміжки часу відбирали по 10 см<sup>3</sup> ферментованої проби, додавали 1,4 см<sup>3</sup> 10%-ї ТХО, ретельно перемішували і через 20 хв занурювали у киплячу водяну баню на 5 хв. Проби охолоджували і фільтрували.

До 2 см<sup>3</sup> фільтрату додавали 2,5 см<sup>3</sup> розчину 5%-ї сірчаної кислоти в льодяній оцтової кислоті, витримували у кип'яченій воді 1 год і після охолодження центрифугували при 10 000 g. Наявність N-ацетилнейрамінової кислоти фіксували спектрофотометричним методом на приладі Opton PMQ-3 за довжини хвилі 450 нм.

Задля встановлення механізму дії молокозсідальних препаратів на міцели казеїну

нами проведено порівняльні дослідження накопичення ГМП залежно від дії на них ензимних препаратів.

Криві, що відображають динаміку накопичення N-ацетилнейрамінової кислоти внаслідок розщеплення  $\alpha$ -казеїну молокозсідальними препаратами, показано на рисунку.



Динаміка накопичення глікомакропептидів та їхніх фрагментів

Дія сичужного ензиму на казеїнові міцели характеризується інтенсивним відщепленням ГМП упродовж перших 60 хв. Цей процес супроводжується підвищенням показника оптичної густини. Подальша двогодинна експозиція ензиму в розчині казеїну за температури 32 °С не призводить до зміни системи (величина оптичної густини практично не змінюється) до моменту реестрації другої точки перегину.

Слід відзначити підвищення значення оптичної густини після другого перегину, оскільки отримані результати дозволяють зробити два припущення.

По-перше, логічно припустити, що на початковому етапі дії сичужного ензиму на казеїн (збільшення значення оптичної густини до першого перегину) відбувається відщеплення ГМП від  $\alpha$ -казеїнів, які містяться на поверхні казеїнових міцел. Це спричинює внутрішньомолекулярні (конформаційні) зміни субодиноць казеїнових міцел, що супроводжується молекулярною перебудовою, яка дозволяє активним центрам молокозсідальних ензимів впливати на глибинні сфери казеїнових субміцел. Унаслідок цього відбувається відщеплення ГМП від важкодоступних внутрішньоміцелярних  $\alpha$ -ка-

зеїнів (збільшення значення оптичної густини після другого перегину).

По-друге, можна припустити, що зареєстроване збільшення оптичної густини після другого перегину пов'язано з неспецифічним протеолізом ГМП, який супроводжується відщепленням N-ацетилнейрамінової кислоти. При цьому вона переходить в інше фізико-хімічне оточення, яке сприяє збільшенню значення оптичної густини.

Більш детальний аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок, що перше припущення суперечить існуючим даним про те, що ензим-субстратні взаємодії за вибраних нами концентраційних співвідношень, а також внутрішньо- і міжмолекулярні структурні перебудови субодиноць казеїнових міцел є високошвидкісними процесами. Таким чином, інтервал між точками перегину, що дорівнює 2 год, мало ймовірний. Водночас друге припущення добре узгоджується із загальноприйнятим уявленням, що сичужний ензим має високу специфічну й низьку неспецифічну протеолітичну активність, а отже, інтервал між накопиченням реєстрованої кількості ГМП і фрагментів його розщеплення може бути досить тривалим.

Окрім того, таке припущення дозволяє з високим ступенем вірогідності інтерпретувати криву, що відображає процес ферментації казеїну препаратом Мейто, який має досить високу неспецифічну протеолітичну активність. При цьому не виключено, що цей препарат здатен розщеплювати вуглеводно-амінокислотні зв'язки. Отже, зображена на рисунку характерна S-подібна крива ензим-субстратної взаємодії казеїну і сичужного ензиму добре узгоджується з даними літератури і переконливо підтверджує присутність двох етапів у дії реніну на казеїновий комплекс: перший — порушення захисного колоїдного стану казеїнової міцели, що призводить у подальшому до утворення молочного згустку, і другий — повільний неспецифічний протеоліз казеїнів молока, зокрема  $\alpha$ -казеїнів і ГМП.

Вплив ензимного препарату ВНИИМС на казеїн ідентичний дії сичужного ензиму з тією лише різницею, що ензими, які входять до складу першого, мають вищу неспецифічну протеолітичну активність. Так, упродовж першої години дії утворюється велика кількість N-ацетилнейрамінової кислоти.

Вплив на казеїновий комплекс еквівалентної за молокозсідальною активністю сичужного ензиму кількості препарату Мейто

призводить до ще більш інтенсивного відщеплення ГМП, особливо протягом першої години інкубації, яке завершується через 3 год з моменту початку реакції. Це ще раз підтверджує значно вищу, порівняно із сичужним ензимом й ензимним препаратом ВНИИМС, протеолітичну активність досліджуваного мікробного ензимного препарату.

Слід наголосити, що використання у два рази зменшеної дози препарату Мейто зумовлює таку саму залежність відщеплення ГМП, як і в разі дії сичужного ензиму або препарату ВНИИМС.

Таким чином, узагальнюючи вищенаведене, можна зробити висновок, що ферментація казеїнових міцел суттєво відрізняється залежно від дії на них досліджуваних ензимних препаратів. При цьому препарат Мейто має високу неспецифічну протеолітичну активність, що спричинює інтенсивне розщеплення ГМП  $\alpha$ -казеїнів. Утім, варто зазначити, що за допомогою використаних під час проведення досліджень методів можна визначити лише сумарну молокозсідальну і неспецифічну протеолітичну активність.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Alais C., Mocquot G., Nitschmann H. S., Zahler P.* Das lab und seine wirkung und das Casein der Milch. Über die Abapaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) aus casein durch Lab. und ihre Beziehung zur Primärreaktion der Labgerinnung der Milch // *Helv. Chim. Acta.* — 1953. — V. 36. — P. 1955–1968.
2. *Fox P. F.* Proteins. — *Developments in Dairy Chemistry.* — London — New-York, 1983. — 283 p.
3. *Звягинцев В. И., Сергеева Е. Г., Гудков А. В.* Заменители сычужного фермента и возможные пути улучшения их качества // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1971. — Т. 7. — Вып. 3. — С. 259–371.
4. *Применение* молокосвертывающих ферментов микробного происхождения в сыроделии // *Экспресс-информация. ЦНИИТЭИмясомолпром. Серия Молочная промышленность. Отечественный производственный опыт.* — М., 1986. — Вып. 8. — 36 с.
5. *Сергеева Е. Г., Звягинцев В. И., Крашенинин П. Ф.* Исследование возможности совместного применения протеаз микробного и животного происхождения для производства сыра // *Труды ВНИИМС.* — М.: Пищевая промышленность, 1974. — Вып. XVI. — С. 42–46.
6. *Баркан М. С., Рамазанова О. Х., Юлиус А. А.* О применении в сыроделии комплекса протеолитических ферментов, выделенных из *Bac. mesentericus* // *Изв. вузов. пищ. технол.* — 1964. — № 6. — С. 58–61.
7. *Пакала Э., Антила В.* Протеолиз, вызванный молокосвертывающими препаратами при выработке сыра // *Труды XXI Международного молочного конгресса. Краткие сообщения.* — М.: ЦНИИТЭИмясомолпром, 1982. — Т. 1. — Кн. 1. — С. 329.
8. *Fox P. F.* Egzogene proteinaze u mljekarakoj tehnologiji // *Mljkarstvo.* — 1980. — V. 30. — N 12. — P. 363–378.
9. *Звягинцев В. И., Сергеева Е. Г., Юлиус А. А.* Исследование характера гидролиза отдельных компонентов казеина некоторыми ферментными препаратами // *Вопр. питания.* — 1973. — № 3. — С. 26–30.
10. *Лебедев А. Б., Толкачев А. Н.* Действие сычужного фермента и его заменителей на казеин // *Мол. пром.* — 1978. — № 1. — С. 19–20.
11. *Visser S.* Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review // *Neth. Milk Dairy J.* — 1981. — V. 35. — P. 65–88.
12. *Parry R. M. J., Carrol R. J.* Location of  $\alpha$ -casein in milk micelles // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1969. — V. 194, N 1. — P. 138–150.
13. *Rose D.* A proposed model of micelle structure in bovine milk // *Dairy Sci. Abstr.* — 1969. — V. 31. — N 4. — P. 171–175.
14. *Schmidt D. J.* Colloidal aspects of casein // *Neth. Milk Dairy J.* — 1980. — V. 34, N 1. — P. 42–64.
15. *Morr C. V.* Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles // *J. Dairy Sci.* — 1967. — V. 50. — P. 1744–1751.
16. *Slattery C. W., Eward R.* A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1973. — V. 317. — P. 529–538.
17. *Davis D. T., Law A. J. R.* An improved method for the quantization fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography // *J. Dairy Res.* — 1977. — V. 44. — N 2. — P. 213–221.
18. *Grappin R., Rank T. C., Olson P.* Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review // *J. Dairy Sci.* — 1985. — V. 68. — N 3. — P. 513–540.
19. *Kirchmeier O.* Chemismus der milchgerinnung // *Milchwissenschaft.* — 1969. — V. 24. — P. 336–343.
20. *Mc Meekin T. L., Hipp N. I., Groves M. L.* The separation of the components of  $\alpha_s$ -casein.

- The separation of  $\alpha_s$ -casein // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — V. 38. — P. 35–39.
21. Garnier J. Models of casein micelle structure // Neth. Milk. Dairy J. — 1973. — V. 27, N 2–3. — P. 240–248.
  22. Звягинцев В. И., Сергеева Е. Г. Методы оценки пригодности молокосвертывающих препаратов — М.: Пищепромиздат, 1962. — 62 с.
  23. Калунянец К. А., Смирнова Т. А., Карликанова Н. Р. Интенсификация производства на основе применения протеолитических ферментных препаратов микробного происхождения в молочной промышленности // Обзор. информ. АгроНИИТЭИ. Сер. Молочная промышленность. — М., 1987. — 48 с.
  24. Сурков Б. А., Краюшкин В. А., Климовский И. И. Новый подход к стандартизации молокосвертывающих ферментных препаратов // Тр. Междунар. мол. конгресса. Краткие сообщения. — М.: ЦНИИТЭИмясомолпром, 1982. — Т. 1. — Кн. 2. — С. 323–324.
  25. Visser S., Van Rocijen P. J., Schattenkern C., Kerling K. E. T. Peptide substrated for chymosin (rennin). Kinetics studies with peptides of different chain length including parts of the sequence 101–112 of bovine  $\alpha_s$ -casein // Biochim. Biophys. Acta. — 1976. — V. 438. — P. 256–272.
  26. Dayhoff M. O. Atlas of proteins sequence and structure. — V. 5. — National Biomedical Research Foundation. — Washington: DC, 1972, 1973, 1976.
  27. Hill R. D., Wake R. G. Amphiphil nature of  $\alpha_s$ -casein as the basis for its micelle stabilizing property // Nature. — 1969. — V. 221. — P. 635–639.
  28. Jolles J., Alais C., Jolles P. The tryptic peptide with the rennin sensitive linkage of cow's  $\alpha_s$ -casein // Biochim. Biophys. Acta. — 1968. — V. 168. — N 3. — P. 591–593.
  29. Mercier J. C., Uro J., Ribadeau-Dumas B., Grosclaude P. Structure primaire des caseinomacropéptide de la casein  $\alpha_s$ -B1 bovine // Eur. J. Biochem. — 1972. — V. 27. — N 3. — P. 535–547.
  30. Green M. L. Review of the progress of dairy science. Milk coagulants // J. Dairy Res. — 1977. — V. 44, N 1. — P. 159–188.
  31. Visser S., Van Rooijen P. J., Schattenkern C., Kerling K. S. T. Peptide substrates for chymosin (rennin). Kinetics studies with bovine  $\alpha_s$ -casein — (103–108) — hexapeptide analogues // Biochim. Biophys. Acta. — 1977. — V. 48. — P. 171–176.
  32. Mulvihill D. M., Fox P. F. Proteolytic specificity of chymosins and pepsins on  $\beta$ -casein // Milchwissenschaft. — 1979. — V. 34. — P. 680–683.
  33. Visser S., Slangen K. J. On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine  $\beta$ -casein // Neth. Milk. Dairy J. — 1977. — V. 31. — P. 16–30.
  34. Garnot P., Molle D. Influence de la nature et du taux d'inactivation sur le dosage de la chymosine et de la pepsine bovine par electro-immuno-diffusion // Lait. — 1982. — V. 62. — P. 671–680.
  35. Nitschmann H., Bohner H. V. Kinetic measurement of the primary reaction of the rennet curdling of milk // Helv. Chim. Acta. — 1955. — V. 36. — P. 1953–1963.
  36. Vanderpoorten R., Weckx M. Breakdown of casein by rennet and microbial milk-clotting enzymes // Neth. Milk. Dairy J. — 1972. — V. 26. — P. 47–59.
  37. Benkha U. Unterauchungen sar wirkung von labraparaten verschiedener heekunft // Milch-wissenschaft. — 1967. — V. 29, N 9. — P. 563–569.
  38. Янковский Д. С., Попова Т. В., Федин Ф. А. Методы выделения и изучения степени очистки казеинового комплекса,  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеина // Направления рационального использования вторичного сырья в молочной промышленности. — К.: УкрНИИИТИ, 1981. — С. 113–123.
  39. Garnier J., Ribadeau-Dumas B., Mocquot G. A new method for the preparation of an immunologically homogeneous  $\beta$ -casein // J. Dairy Res. — 1964. — V. 31, N 1. — P. 131–137.
  40. Теплы М., Машек Я., Гавлова Я. Молокосвертывающие ферменты животного и микробного происхождения. — М.: Пищевая промышленность, 1980. — 272 с.
  41. Hess L. E., Alvin F. A new method for measuring sialic acid levels in serum and its application to rheumatic fever // J. Clin. Invest. — 1957. — V. 37, N 3. — P. 449–455.
  42. Раманаускас Р., Урбене С. Изменение количества свободных сиаловых кислот во время формирования сгустка // Тр. Лит. фил. ВНИИМС. — Вильнюс: Мокслас, 1973. — Вып. VIII. — С. 145–150.
  43. Черников М. П., Никольская Г. В. Роль гликомакропептида в процессе свертывания молока // Прикл. биохим. микробиол. — 1971. — Т. 7. — Вып. 3. — С. 272–273.

**ДЕЙСТВИЕ ЭНЗИМНЫХ  
МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ  
НА ПРОТЕИНОВЫЙ КОМПЛЕКС  
МОЛОКА**

*С. В. Бородай  
З. В. Бондарчук*

Технологический институт молока и мяса  
УААН, Киев

*E-mail: timm@fm.com.ua*

В обзоре приведены данные литературы и собственные данные авторов, касающиеся специфического действия молокосвертывающих энзимных препаратов на протеиновый комплекс молока, в частности на  $\alpha$ -казеиновую фракцию. Проанализированные данные свидетельствуют о том, что условия образования сычужного сгустка при производстве сыра известны, но сам механизм процесса свертывания до сих пор является дискуссионным. Показано, что исследуемые энзимные препараты в значительной степени отличаются между собой по своим свойствам специфического протеолиза протеинов молока.

**Ключевые слова:** энзимы, протеины, молоко, протеолиз, сыр.

**INFLUENCE OF ENZYMES' CURD  
FORMATION PREPARATIONS  
ON THE PROTEINS COMPLEX  
OF MILK**

*S. V. Boroday  
Z. V. Bondarchuk*

Technological Institute of Milk and Meat  
of UAAS, Kyiv

*E-mail: timm@fm.com.ua*

The information concerning specific effect of curd formation enzymes on the proteins complex of milk in particular on  $\alpha$ -casein fraction are given in the review. The analyzed data show that the terms of rennet curd formation are known for cheese makers, but a mechanism of curd formation process is debatable until now. It is reported that the investigated enzymes preparations differ by the properties of specific proteolysis of milk proteins.

**Key words:** enzymes, proteins, milk, proteolysis, cheese.